

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年2月17日 (17.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/014038 A1

(51) 国際特許分類7: A61K 39/12, 39/09,
39/106, 39/13, 39/145, 39/165, 39/20, 39/21, 39/235,
39/245, 39/25, 39/285, 39/39, A61P 31/12

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/011488

(22) 国際出願日: 2004年8月10日 (10.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-291879 2003年8月11日 (11.08.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人阪大微生物病研究会 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学内 Osaka (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒1628640 東京都新宿区戸山1丁目23番1号 Tokyo (JP). 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 長谷川秀樹 (HASEGAWA, Hideki) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷3-43-8-314 Tokyo (JP). 倉田毅 (KURATA, Takeshi) [JP/JP]; 〒1850034 東京都国分寺市光町3-25-2 Tokyo (JP). 佐多徹太郎 (SATA, Tetsutarou) [JP/JP]; 〒1360076 東京都江東区南砂1-3-3-504 Tokyo (JP). 森山雅美 (MORIYAMA, Aya) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷3-43-8-314 Tokyo (JP).

Masami) [JP/JP]; 〒2320064 神奈川県横浜市南区別所1-13-20-311 Kanagawa (JP). 田村慎一 (TAMURA, Shin-ichi) [JP/JP]; 〒5650862 大阪府吹田市津雲台5-16 ディー56-302 Osaka (JP). 谷本武史 (TANIMOTO, Takefumi) [JP/JP]; 〒5650854 大阪府吹田市桃山台2-3 ディー6302 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山本秀策, 外 (YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号クリスタルタワー15階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL VACCINE CONTAINING ADJUVANT CAPABLE OF INDUCING MUCOSAL IMMUNITY

(54) 発明の名称: 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン

(57) Abstract: Adjuvant having an adjuvant capacity superior to those of conventional adjuvants and capable of effecting protective reactions over strains. This adjuvant has been developed on the basis of the finding that a double stranded RNA (for example, Poly(I:C)) when used in combination with a subunit antigen unexpectedly has the above capability. Thus, there is provided a vaccine for mucosal administration, comprising a double stranded RNA (A) and, as a pathogen, a subunit antigen or inactivated antigen (B).

(57) 要約: 従来のアジュバント以上にアジュバント能を有し、株を越えた防御反応を提供し得るアジュバントを提供すること。 サブユニット抗原とともに用いた場合、二本鎖RNA(例えは、Poly(I:C))が予想外に上記能力を有していることを見いたすことによって解決された。従って、本発明は、粘膜投与のためのワクチンであって、A) 二本鎖RNA; およびB) 病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、を含む、ワクチンを提供する。

WO 2005/014038 A1

明 細 書

粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、新規ワクチン構成に関する。より詳細には、二本鎖RNAをアジュバントとして用いた新規ワクチンに関する。

背景技術

[0002] 現行の認可ワクチンには、以下のような限界がある。例えば、インフルエンザウイルス(特にA型インフルエンザウイルス)では抗原変異が顕著に生じ、それまでのワクチン(すなわち、それまでに獲得された感染)により生じている抗体では中和されないウイルスが発生することが頻繁であり、ワクチンの効力が一シーズンのみに終わることが多い。また、表面糖タンパク質(ヘマグルチニン[赤血球凝集素;HA]およびノイラミニダーゼ[NA])をコードする遺伝子の点突然変異(抗原連続変異)、抗原の不連続変異により免疫学的に異なる新規の株が生じることが頻繁にある。なお、この場合、内部タンパク質は連続変異株および不連続変異株内でも比較的高度に保存される。現行のワクチンによる免疫は、細胞性免疫を基礎にした異種株間共通免疫ではなく、同種株液性免疫を引き出すに過ぎないことから、流行する株とワクチンの株とが異なると効果は減弱することになる。

[0003] あるいは、インフルエンザウイルスの優勢流行株が、ある年からその翌年にかけて有意に不連続変異または連続変異しない場合でも、抗体力価が低減するため、免疫は毎年実施しなければならないという欠点もある。血球凝集阻止(HI)および中和の抗体は数か月から数年存続し、その後次第に低減することが報告されている。しかし、そのような低減が見られない場合でも、年に1度の接種が推奨されている。なぜなら、ワクチン接種後その年内に抗体力価が低減する可能性があるからである。

[0004] ワクチンの有効性には改良の余地が有る。なぜなら、次シーズンのワクチンの開発は、次の流行株を予測することに依存する。従って、このような予測には不正確性が伴い、ワクチン用に用いる株と実際に野外で流行するものが適合しないということが起こり得る。また、新型株が生じる場合は、例えば、1992～1993年のインフルエン

ザシーズン中に起きたように、新規のH3N2株(A/Beijing/92)の出現に対して、予測されたワクチンは無効であることが多い。新型ウイルスは、インフルエンザシーズンの後期になってから臨床的に明らかになることが多く、現状では、認可ワクチンの製造および調剤に時間を要するために、既存のワクチンによる防御が不十分である場合が多い。仮にワクチンの株と流行株とがよく適合した場合でも、認可ワクチンは小児および青年の約70%、高齢者の30-40%の疾患を予防するに過ぎないといわれている。

- [0005] 従来のワクチンでは特に、粘膜(例えば鼻腔)免疫を行うことはほとんど不可能であり、特に、インフルエンザウイルスなどで主流である皮下接種型の現行の不活化ワクチン、成分ワクチンなどでは、粘膜免疫を惹起できないことがわかっており、そのような粘膜免疫を惹起し得るワクチン組成物が渴望されている。
- [0006] また、従来のワクチンでは株間でさえ交叉免疫を惹起し得ないことから、少なくとも株間あるいはサブタイプ間でも交叉免疫を惹起し得るワクチンの開発もまた渴望されている。A株2種およびB株1種の混合物が主流であるインフルエンザワクチンでは、特に、予測が不要になるか少なくとも低減されるようなワクチンの開発も渴望されている。
- [0007] さらに、ワクチンとして簡便な接種法である粘膜接種で有効なワクチンもまた渴望されている。これは、特にインフルエンザウイルスなどでは、現在行われていないことから、集団免疫を容易にする意味からもその解決策の登場が待ち望まれている。あるいは、抗体持続期間が増大するようなものもまた渴望されている。
- [0008] 非特許文献1(*J. Clinical Investigation*, 110(8), 1175-1184, (2002))は、Poly(I:C)をアジュバントとするUV不活化whole(全体)インフルエンザウイルスを気道経路で投与したことが開示されている。しかし、IgG抗体の上昇はPoly(I:C)を加えない場合と差が無いことが非特許文献1の図2に示されている。したがって、Poly(I:C)はアジュバントとしてはそれほど有効ではないことが示唆されている。また、抗体を上昇させるためには短鎖のリン脂質を併用することが記載されている。
- [0009] 非特許文献2(*Invest. Ophthalmol.*, 10(10), 750-759(1971))および非特許文献3(*Invest. Ophthalmol.*, 10(10), 760-769, (1971))は、Poly(I:C)

をアジュバントとする不活性ワクチニアウイルスを経鼻接種することが記載されている。しかし、非特許文献2は、涙液中のIgA抗体産生が増加することを記載するが、感染予防効果には言及していない。

- [0010] 特許文献1(特公昭50-2009号(US3906092)Merck & Co)は、吸着型アジュバントにポリヌクレオチド(Poly(I:C)を含む)を加えることにより、インフルエンザワクチンの抗体反応を増進させることを開示している。しかし、特許文献1は、感染予防効果には言及していない。
- [0011] 非特許文献4(Veterinary Microbiology, 88(4), 325-338, (2002))は、Poly(I:C)をアジュバントとする不活性ワクチンを腹腔内接種後、IgG, IgMの有為な上昇を報告するが、鼻腔などへの粘膜投与での効果は示されておらず、しかも、感染予防効果には言及していない。
- [0012] 非特許文献5(Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 133, 334-338(1970))は、Poly(I:C)をアジュバントとして羊赤血球を静注して免疫する時、血中抗体が上昇することを報告しているが、感染予防効果には言及していない。
- [0013] 非特許文献6(The Journal of Immunology, 149, 981-988(1992))は、コレラ毒素のアジュバントとしての可能性を記載するが、二本鎖RNAについてはなんら記載していない。

特許文献1:特公昭50-2009号

非特許文献1:J. Clinical Investigation, 110(8), 1175-1184, (2002)

非特許文献2:Invest, Ophthalmol., 10(10), 750-759(1971))

非特許文献3:Invest. Ophthalmol., 10(10), 760-769, (1971)

非特許文献4:Veterinary Microbiology, 88(4), 325'338, (2002)

非特許文献5:Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 133, 334-338(1970)

非特許文献6:The Journal of Immunology, 149, 981-988(1992)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0014] 上述のような状況の中、本発明は、粘膜投与するとき、従来のアジュバント以上にアジュバント能を有し、株を越えた防御反応を提供し得るアジュバントを提供することを

課題とする。

課題を解決するための手段

- [0015] 上記課題は、サブユニット抗原とともに用いた場合、二本鎖RNA(例えば、Poly(I:C))が予想外に上記能力を有していることを見いだしたことによって解決された。
- [0016] 上述のように、現行の不活化インフルエンザHAワクチンは、有効なワクチンであるが、インフルエンザウイルスの進入門戸である呼吸器粘膜上皮でのIgA抗体の誘導は低いことから、これを改善することにより、さらに効果が増強できると考えられる。
- [0017] そこで、マウスのインフルエンザモデルにおいてアジュバント併用経鼻ワクチンを用いて気道粘膜に交叉反応性の高い分泌型IgA抗体を産生させることを試みた。アジュバントとしてコレラ毒素Bサブユニット(CTB*)を用い良好な結果が得られた。しかし、ヒトでの経鼻投与を考えた場合、コレラ毒素は顔面神経麻痺などの副作用が報告されていることから、コレラ毒素を用いたアジュバントを使用せずに、IgG抗体を誘導できたならば、より安全なワクチンになると考えられる。IgAは、補体系の第2経路を活性化し、粘膜感染における局所免疫反応に重要な働きを持つが、そのIgAの血漿中半減期は5ー6日であり、新たに置き換えられていることから、例えば涙液中のIgAが増加したと
しても感染予防効果まで予測できないと考えられる。
- [0018] そこで、生態の微生物成分を認識し、自然免疫系を刺激するToll様レセプター(TLR)のあるリガンドが安全性に優れていて、粘膜ワクチンの強力なアジュバントになり得る可能性があるかを検討したところ、予想外の感染防御効果を示す粘膜投与ワクチンを得ることができた。
- [0019] 従って、本発明は、以下を提供する。
- [0020] (1) 粘膜投与のためのワクチンであって、
 - A) 二本鎖RNA; および
 - B) 病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
を含む、ワクチン。
- [0021] (2) 上記粘膜は、鼻の粘膜を含む、項目1に記載のワクチン。
- [0022] (3) 上記病原体は、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイル

ス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、風疹ウイルス、重症急性呼吸器症候群ウイルス(SARSウイルス)、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎菌およびコレラ菌からなる群より選択される、項目1に記載のワクチン。

- [0023] (4) 上記病原体は、インフルエンザウイルスである、項目1に記載のワクチン。
- [0024] (5) 上記サブユニットは、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、PB1、PB2、PAおよびNS2からなる群より選択される少なくとも1つのサブユニットを含む、項目1に記載のワクチン。
- [0025] (6) 上記二本鎖RNAは、分泌型IgAを產生するに十分な濃度で存在する、項目1に記載のワクチン。
- [0026] (7) 上記二本鎖RNAは、0.1～10mg/mlの濃度で存在する、項目1に記載のワクチン。
- [0027] (8) 上記二本鎖RNAのサイズは、10²～10⁸bpである、項目1に記載のワクチン。
- [0028] (9) 上記サブユニットは、少なくともNAまたはHAを含む、項目1に記載のワクチン。
- [0029] (10) 上記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、項目1に記載のワクチン。
- [0030] (11) 感染疾患を予防するための方法であって、
 - A)粘膜投与のためのワクチンであって、
 - a)二本鎖RNA;および
 - b)病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
 - を含む、ワクチンを、少なくとも1回粘膜投与する工程を包含する、方法。
- [0031] (12) 上記ワクチンの投与は、少なくとも2回行われる、項目11に記載の方法。
- [0032] (13) 上記ワクチンの投与は、間隔が少なくとも1週間以上である、より好ましくは3週間以上である、項目11に記載の方法。
- [0033] (14) 上記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、項目11に記載の方法。
- [0034] (15) 感染疾患を予防するためのワクチンキットであって、
 - A)粘膜投与のためのワクチンであって
 - a)二本鎖RNA;および

b)病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
を含む、ワクチン;ならびに
B)上記ワクチンを、少なくとも1回粘膜投与することを指示する指示書、
を備える、キット。

- [0035] (16) 上記ワクチンの投与は、少なくとも2回行われる、項目15に記載のキット。
- [0036] (17) 上記ワクチンの投与は、間隔が少なくとも1週間以上である、より好ましくは3週間以上である、項目15に記載のキット。
- [0037] (18) 上記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、項目15に記載のキット。
- [0038] (19) 二本鎖RNAの、ワクチンの粘膜投与のための使用。
- [0039] (20) 上記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、項目19に記載の使用。
- [0040] (21) 二本鎖RNAの、粘膜投与のためのワクチンの製造のための使用。
- [0041] (22) 上記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、項目21に記載の使用。

発明の効果

- [0042] 本発明により、粘膜投与により簡単にワクチン接種し、かつ、交叉免疫性を得ることができるワクチン形態が提供される。これにより、例えは、インフルエンザウイルスでは、流行株を予測しなくとも、有効なワクチンを製造することができ、効率よい予防対策を講じることが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0043] [図1]図1は、実施例において例示される、Poly(I:C)のアジュバント効果を示すデータである。左の欄は、投与形態を示し、中の欄は、鼻洗浄液中のIgA量を示し、右の欄は、血清中のIgA量を示す。
- [図2]図2は、実施例において例示される、Poly(I:C)のアジュバント効果を示すデータである。左の欄は、投与形態を示し、右の欄は、ウイルスの生存状況を示す。
- [図3]図3は、種々のウイルス株に対する本発明のワクチン接種のIgA惹起効果を示す図である。
- [図4]図4は、種々のウイルス株に対する本発明のワクチン接種のウイルス増殖抑制効果を示す図である。
- [図5]図5は、本発明のワクチン接種の脳内投与における毒性を示す図である。上は

本発明のPoly(I:C)を示し、下はポジティブコントロールのCTB*を示す。

[図6]図6は、不活化ウイルス粒子をPoly(I:C)と併用する経鼻インフルエンザワクチンとして用いたときの免疫効果: 鼻洗浄液と血清中抗HAおよび抗NA抗体価を示す。

[図7]図7は、不活化ウイルス粒子を種々サイズ(L, M, H)のPoly(I:C)と併用する経鼻インフルエンザワクチンとして用いたときの免疫効果: 鼻洗浄液および血清中流HAと抗NA抗体価を示す。

[図8]図8は、2本鎖RNAあるいは単鎖RNAとサブユニットHAを併用する経鼻インフルエンザワクチンとして用いたときの免疫効果: 鼻洗浄液および血清中抗HA抗体価を示す。

[図9]図9は、一週間以上の間隔で2回以上の投与がPoly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性を示す結果である。

[図10]図10は、Poly(I:C)は百日咳ワクチンに対する防御免疫をも高め、インフルエンザ以外の感染症に対するワクチンに対する防御免疫増強にも有効であることを示す結果である。

発明を実施するための最良の形態

[0044] 以下に本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

[0045] (定義)

本明細書において「ワクチン」とは、身体中に投与されて、活性な免疫を生成する、通常感染性因子または感染因子のある部分を含む抗原性懸濁液または溶液をいう。ワクチンを構成する抗原性部分は、微生物(例えば、ウイルスまたは細菌など)または微生物から精製された天然の産生物、合成生成物または遺伝子操作したタンパク質、ペプチド、多糖または同様な産生物であり得る。生ワクチンとしては、例えば、BCG、種痘、ポリオ、水痘、はしか、風疹、おたふくかぜ、牛痘、NDV、マレック病などが挙げられるがそれらに限定されない。不活化ワクチンとしては、百日咳、ジフテリア(ト

キソイド)、破傷風(トキソイド)、インフルエンザ、日本脳炎などが挙げられるがそれらに限定されない。

- [0046] 本明細書において「不活化抗原」とは、ワクチン用抗原として使用される、感染能を失わせた抗原をいい、完全ウイルス粒子であるビリオン、不完全ウイルス粒子、ビリオン構成粒子、ウイルス非構造タンパク質、感染防御抗原、中和反応のエピトープなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において「不活化抗原」とは、感染力を失わせるが免疫原性を保持させた抗原をいい、そのような抗原がワクチンとして使用されるときは、「不活化ワクチン」という。そのような不活化抗原としては、例えば、物理的(例えば、X線照射、熱、超音波)、化学的(ホルマリン、水銀、アルコール、塩素)などの操作により不活化されたものが挙げられるがそれらに限定されない。サブユニット抗原自体も、通常感染力が喪失されていることから、不活化抗原の定義内に入る。あるいは、死滅したウイルスを使用してもよい。
- [0047] 本明細書においてウイルスの「サブユニット抗原」とは、「成分」ともいい、そのようなサブユニット抗原は、天然のウイルスなどの病原体から精製してもよく、合成または組換え技術により作製してもよい。そのような方法は当該分野において周知であり、慣用されるものであり、市販される機器、試薬、ベクターなどを用いて実施することができる。例えば、インフルエンザウイルスでは、ヘマグルテニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、マトリクス(M1、M2)、非構造(NS)、ポリメラーゼ(PB1、PB2:塩基性ポリメラーゼ1および2、酸性ポリメラーゼ(PA))、核タンパク質(NP)などの、粒子の表面にでている分子であることが好ましい。現在HAは15種類、NAは9種類が知られており、これが変わると新しい株が生まれ得る。
- [0048] 本明細書において「アジュバント」とは、投与された免疫原と混合するとき、免疫応答を増加するか、あるいはそうでなければ変更する物質である。
- [0049] 本明細書において「CT」または「コレラ毒素」とは、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)の產生する外毒素で、コレラ菌感染による下痢症状の原因物質をいう。コレラ毒素は、有効なアジュバントとして使用されているが、その毒性のために臨床応用はされていない。従って、通常CTは、ワクチンの有効なアジュバントを探索する際のポジティブコントロールとして使用される。

- [0050] 本明細書において「二本鎖RNA」とは、任意の二本鎖のRNAをいう。そのサイズは、たとえば、ゲル電気泳動などで測定され得る。従来二本鎖RNAをワクチンのアジュバントとして用いる試みはなされているが、ワクチンが感染防御に有効であったという報告はほとんどなされていない。そのような二本鎖RNAとしては、Poly(I:C)、Poly(A:U)、Poly(G:C)などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0051] 本明細書において「Poly(I:C)」とは、ポリイノシン酸(pI)とポリシチシン酸(pC)とを含む二本鎖RNAであり、上述の二本鎖RNAの範囲内に入る。
- [0052] 本明細書では、不活化抗原またはサブユニット抗原のいずれもがその抗原として用いられ得る。
- [0053] 本明細書において「粘膜投与」とは、粘膜を経由する投与形態をいう。本明細書において「粘膜」とは、脊椎動物において、消化器、呼吸器、泌尿生殖器など特に外通性の中腔器官の内壁をいう。従って、そのような粘膜投与としては、例えば、鼻腔投与(経鼻投与)、口腔投与、膣内投与、上気道投与、肺胞投与などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、鼻腔投与が有利である。鼻腔は特に、インフルエンザウイルスなどの呼吸器系感染疾患の感染経路でもあることから、粘膜投与によりIgA反応を引き起こすことも可能であるからである。
- [0054] 本明細書において「経鼻投与」とは、鼻粘膜を経由した投与方法をいう。
- [0055] 本明細書において「病原体」とは、宿主に対して疾患または障害を発生し得る生物をいう。ヒトに対する病原体としては、例えば、ウイルス、細菌、原虫、リケッチャ、クラミジア、真菌などが挙げられるがそれらに限定されない。ワクチンが有効とされるのは、通常、ウイルス、細菌などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0056] 本明細書において対象とされるウイルスは、どのような種類のものでもよく、DNAウイルス、RNAウイルスなどが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0057] ヒトにとって病原体であるウイルスとしては、例えば、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、風疹ウイルス、SARSウイルス(コロナウイルスの一種)、HIVが挙げられるがそれらに限定されない。このようなウイルスは、好ましくはインフルエンザウイルスである。

- [0058] 本発明が対象とする細菌は、どのような細菌であってもよく、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌が挙げられるがそれらに限定されない。
- [0059] ヒトにとって病原体である細菌としては、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎菌およびコレラ菌などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0060] 本明細書において「インフルエンザウイルス」とは、オルソミクソウイルス科に属する一鎖RNAウイルスである。脂質二重膜のエンベロープを持ち、M1(膜タンパク質)に裏打ちされ、その膜にM2、HA(血球凝集素)、NA(ノイタミニダーゼ)およびM2の糖タンパク質といった特徴的な膜タンパク質がはまり込んでいる。RNAは8つに分節しており、これらは核タンパク質とともに複合体RNP(リボヌクレオシドカプシド)を形成し、エンベロープ裏打ちタンパク質M1に弱く結合している。
- [0061] インフルエンザウイルスのタンパク質のうちHAおよびNAは、小胞体膜にはまり込んだ形で作られ、ゴルジ装置を経て細胞表面に出る。従って、HAまたはNAあるいはその両方は、良好な免疫原であり、ワクチンの主原料として使用されている。
- [0062] 本明細書において「分泌型IgAを産生するに十分な濃度」とは、アジュバントまたはワクチン自体の能力をいい、投与された後、免疫反応が起こるときに、分泌型IgAを産生することができる、アジュバントまたはワクチン自体の濃度をいう。そのような濃度は、インビトロまたはインビボで当該分野において公知の方法を用いて実施することができる。
- [0063] 本明細書において「分泌型IgA」とは、分泌性であるIgAをいう。IgAは、外分泌液中の主要な免疫グロブリンで、粘膜表面の感染防御に役立っている。唾液、鼻汁、腸、気管などの分泌液中、あるいは初乳中に多く見られるが血清中にも存在する。このような分泌型IgAの測定方法としては、例えば、免疫拡散法が挙げられるがそれらに限定されず、例示的な好ましい方法としては、実施例に記載されるようなものを用いることができる。
- [0064] (本発明において使用され得る一般生化学手法の説明)
(ワクチンの作製法)
- 本明細書においてワクチン中に含まれるサブユニット抗原または不活化抗原は、上述のように、ワクチンから不活化、精製などにより天然の材料から作製することができ

るし、あるいは遺伝子工学的にポリペプチドを調製することまたは合成により人工的に作製することができる。通常、本発明のワクチンは、ウイルスなどを発育鶏卵などを用いて増殖し、増殖したウイルスなどを不活化またはその中から成分を分離精製することによって製造することができる。

- [0065] 本明細書において本発明のワクチンは、液状または乾燥した形態で、密栓したバイアル瓶、シリンジ、アトマイザーまたはそれに類するもの、あるいは熔封したアンプルに入れて提供され得る。
- [0066] インフルエンザウイルスワクチンを製造する場合は、以下のようない手順を用いることができるがそれに限定されない。
- [0067] 目的のインフルエンザウイルス株としては、例えば、A/Beijing/352/89(H3N2); A/Texas/36/91(H1N1); B/Panama/45/90; A/Georgia/03/93; A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2); B/Shangdong/7/97; B/Johannesburg/5/99などが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0068] これらのウイルスは、例えば、9～11日齢発育鶏卵胚中で継代により増殖させ、必要に応じて、培養細胞(例えば、MDCK細胞)中で増殖させる。ウイルスは、Massicot et al. (Virology 101, 242–249(1980))が記載した方法またはその変法により精製することができる。手短に言えば、ウイルス懸濁液を8000rpmで遠心分離(例えば、Sorvall RC5C遠心分離器。GS-3ローター)して明澄化し、次いでBeckman 19型ローターで18,000rpmで2時間遠心分離してペレットとする。
- [0069] ペレット化ウイルスをSTE(0.1M NaCl, 20mM Tris, pH7.4, 1mM EDTA)中に再懸濁し、4,000rpmで10分遠心分離(Hermle Z360K遠心分離器)して、凝集物を除去する。上清2mlを、60%ショ糖 2mlとSTEで緩衝した上層の30%ショ糖 7mlから成る不連続ショ糖勾配上に層とし、36,000rpm(SW-40ローター、Beckman)で90分遠心分離する。
- [0070] バンド化ウイルスを界面で収集し、STEで10倍に希釈して、30,000rpmで2時間(Beckman Ti45ローター)ペレット化する。次にペレット化ウイルスを-70℃で凍結する。

[0071] ウィルスのサブユニット抗原は、組換えDNA技術を用いて培養(例えば、CHO-K1細胞)により生産することができる。発現ベクターとしては、pCXN(Matsunami K., et al., (Clinical & Experimental Immunology 126(1), 165-172(2001))等を利用することができますがそれらに限定されない。形質転換した細胞は、可溶化緩衝液(8% Triton X-100、2M KC1、10mM リン酸ナトリウム緩衝剤(pH7.0))等に溶解し、等量のPBSを加えて懸濁し、例えば、360,000rpmで遠心分離(例えば、Beckman XL-70遠心分離機Type 55.1Tiローター)することにより可溶性画分を回収する。回収された可溶性画分は、目的とする抗原またはそれに付加されたペプチド配列に特異的に親和性を持つモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体をはじめとするタンパク質またはペプチドなどを担体に結合させたアフィニティカラムに吸着させ、0.1M グリシン-HCl、0.1% Tween 80(pH2.7)等、pHその他の変化により結合力を減弱せしめる溶液を用いて溶出し、精製することができる。また、溶媒抽出法、硫安沈殿等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-Sephadex、DIAION HPA-75(三菱化学)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどの樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲル濾過法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動法等の手法を用いることができる。精製された抗原は、PBSなどの緩衝液で透析し、例えば、-70°Cで凍結することができる。

[0072] このような形でワクチンを生成することができる。

[0073] (アジュバント)

アジュバントは、抗原と組み合わせることで抗体産生の増大、免疫応答の増強を起こす物質の総称であり、より好ましい実施形態では、変調させるか、または効力のある無毒のアジュバントが使用される。アジュバントは通常のワクチン抗原とともに使用して、より早い、より効力のある、あるいはより延長した応答を誘発するために要求される。このようなアジュバントは、また、抗原の供給が限定されるか、あるいは产生にコストがかかる場合において有用である。

[0074] アジュバントは、例えば、鉱物、バクテリア、植物、合成または宿主の産生物に場合

に応じて分類される。

- [0075] 第一のクラスは、鉱物のアジュバント、例えば、アルミニウム化合物である。アジュバントとしてのアルミニウム化合物の最初の使用は1926年に記載された。その時以来、アルミニウム化合物とともに沈澱させた抗原あるいは予め形成されたアルミニウム化合物と混合されまたはそれに吸着された抗原が、動物およびヒトにおける免疫応答の増強するために使用されている。アルミニウム化合物および同様なアジュバントは次のメカニズムを通して働くようである。アルミニウムは、抗原に物理的に結合して粒子を形成し、注射後組織の抗原の吸収速度を遅くさせ、こうして抗原と抗原を提示する細胞、例えば、マクロファージまたは濾胞-樹状細胞との間の相互作用の時間を延長する。あるいは、アジュバントは、さらに、そのような相互作用を活性化する。アルミニウム粒子はウサギの局所リンパ節において免疫後7日に実証され、そして他の有意の機能が節それら自体におけるT細胞含有領域に抗原を向けることがあり得る。アジュバントの効力は、所属リンパ節の活性化と相関関係を有することが示されている。多数の研究はアルミニウムとともに投与された抗原が液性免疫を活性化することを証明したが、細胞性免疫性は、わずかに増加するだけあるように思われる。アルミニウムは、また、補体の経路を活性化するとして記載された。このメカニズムは局所炎症反応ならびに免疫グロブリンのメモリーにおいてある役割を演じ得る。
- [0076] アルミニウム化合物は現在ヒトにおいて使用されているほぼ唯一の安全なアジュバントである。しかし、アルミニウムを含有するワクチンは時々局所的反応を引き起こす。アレルギーの発現は通常臨床的に大きな問題でないが、アルミニウム化合物は、また、好酸球をT細胞依存性メカニズムを経て注射領域に誘導し、抗原のプライミング後IgEの応答を誘発し、そしてIgEの応答についてヘルパー機能をもつ特異的細胞の集団を活性化するといわれている。
- [0077] バクテリア由来のアジュバントは最近精製されそして合成されている(例えば、ムラニルジペプチド、リピドA)。また、宿主由来免疫活性タンパク質は、クローニングされている(インターロイキン1およびインターロイキン2)。最近、ボルデテラ・ペルツシス(*Bordetella pertussis*)、リポ多糖およびフロイント完全アジュバント(FCA)が実験室レベルで使用されつつある。

- [0078] 他の物質もまた、アジュバントとして種々使用されてきている。それらは植物産生物、例えば、サポニン、動物産生物、例えば、キチンおよび多数の合成化学物質を包含する。
- [0079] 本明細書では、二本鎖RNAがアジュバントとして使用される。この二本鎖RNAの調製方法は、上述の核酸分子の調製方法に準ずることができ、当該分野において周知の方法を用いることができる。そのようなものの例示としては、シグマ・アルドリッヂャパン(株)、ヤマサ醤油、Flukaなどからが入手可能であるキットを用いることができる。
- [0080] Poly(I:C)もまた、当該分野において周知の方法を用いて製造することができる。そのような方法は、非特許文献1～3などに記載されており、例えば、好ましくは、2つの選択したホモポリマーをpH7.0(0.006モルリン酸ナトリウム、0.15モル塩化ナトリウム)のリン酸緩衝液に等モルの濃度で混ぜることなどが挙げられるがそれらに限定されない。複合体は、混合後直ちに形成され得る。
- [0081] (コンピュータスクリーニング)
タンパク質立体構造データスクリーニングのために、本発明の因子(例えば、抗原または不活化抗原、抗体)、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ・スクリーニング(コンピュータを用いた系)の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。従って、このようなスクリーニングによって得られた薬物もまた、本発明のワクチンの成分として用いることができる。
- [0082] (疾患)
本明細書において本発明が対象とし得る疾患は、ワクチン投与によって予防し得る任意の疾患を包含する。そのような疾患としては、細菌性疾患、ウイルス性疾患、アレルギー疾患などが挙げられるがそれらに限定されず、例えば、水痘、麻疹、ムンプス、ポリオ、ロタ、インフルエンザ、風疹、重症急性呼吸器症候群(SARS)、百日咳、皰

膜炎およびコレラ、RS(呼吸器性シンシチウム)ウイルス感染症、インフルエンザb型菌、肺炎球菌感染症、後天性免疫不全症候群(AIDS)などが挙げられるがそれらに限定されない。

[0083] (治療活性または予防活性の証明)

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、および動物レベルで、所望の治療活性または予防活性について試験される。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術を利用して決定され得る。本発明に従つて、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、抗原と抗体との結合を観察することなどが挙げられる。動物レベルの試験では、ヒトと同様にワクチンを投与し、抗体力値の上昇(例えば、ELISAによる)、あるいは細胞障害性T細胞の活性化などを確認することによって判定することができる。

[0084] (予防のための投与および組成物)

本発明の組成物、ワクチンなどで用いられ得る薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、增量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、ワクチン、またはその改変体もしくは誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

[0085] 本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 α -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン)；親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)；アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン)；モノサッカリド、ジ

サッカリドおよび他の炭水化物(グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む)；キレート剤(例えば、EDTA)；糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)；塩形成対イオン(例えば、ナトリウム)；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤(例えば、Tween、フルロニック(pluronic)またはポリエチレングリコール(PEG))などが挙げられるがそれらに限定されない。

- [0086] 例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤(例えば、スクロース)を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。
- [0087] 以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。
- [0088] 本発明のワクチンなどは、薬学的に受容可能なキャリアと配合して非経口的に投与することができる。
- [0089] 本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤(日本薬局方第14版またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照)と、所望の程度の純度を有する糖鎖組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。
- [0090] 様々な送達系が公知であり、本発明では粘膜投与が企図される。本発明の化合物を投与するために用いられ得る技術としては、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルなどが挙げられる。導入方法としては、鼻腔内、膣内、気道下、口腔内、直腸粘膜および腸粘膜などの粘膜経路が挙げられるがそれらに限定されない。この場合、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。粘膜投与する場合には、例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

- [0091] 特定の実施形態において、本発明の化合物または組成物を、投与部位の粘膜面のみならず、その他の組織の粘膜面においてもIgA分泌亢進可能であるような粘膜面に局所的に投与することが望まれ得る。
- [0092] 本発明の予防方法において使用される組成物の量は、使用目的、対象疾患(種類など)、患者の年齢、体重、既往歴などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体(または患者)に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、既往歴、および経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回(例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回)の投与、あるいは毎年流行前に1回の頻度などが挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましく、少なくとも約1週間の間隔をあけて追加免疫をすることが有利である。より好ましくは、追加免疫の間隔は少なくとも約3週間であり得る。
- [0093] 本発明のワクチンなどの投与量は、被験体の年齢、体重、症状または投与方法などにより異なり、特に限定されないが、通常成人1日あたり、経口投与の場合、10mg-1gであり得る。粘膜(例えば経鼻)投与の場合、0.001mg-10mgであり、好ましくは、0.1mg-1mgであり得る。
- [0094] 本明細書中、「投与する」とは、本発明のワクチンなどまたはそれを含む医薬組成物を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて処置が意図される宿主に与えることを意味する。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもししくは並行して;または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わされた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に(例えば、同じ個体へ別々の粘膜を通じての場合)投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。
- [0095] 本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人(患者本人であり得る)に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、予防薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監

督官庁(例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局(FDA)など)が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書(package insert)であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、瓶に貼り付けられたフィルム、電子媒体(例えば、インターネットで提供されるホームページ(ウェブサイト)、電子メール)のような形態でも提供され得る。

- [0096] 本発明の方法による予防処置の終了の判断は、市販のアッセイもしくは機器使用によって惹起される抗体を確認することによって行うことができる。
- [0097] 本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分を満たした1つ以上の容器を備える薬学的パッケージまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に任意に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。
- [0098] (好ましい実施形態の説明)
以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参考して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことは明らかである。
- [0099] 1つの局面において、本発明は、粘膜投与のためのワクチンを提供する。このワクチンは、A)二本鎖RNA; およびB)ウイルスのサブユニット抗原または不活化抗原、を含む。ここで、二本鎖RNA、ウイルスサブユニット抗原および不活化抗原は当該分野において周知の方法により調製することができる。粘膜投与のために適切な形態は、当該分野において周知であり、例えば、液状にすること、あるいは、噴霧形態にすることなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明は、二本鎖RNAとウイルスサブユニット抗原または不活化抗原との組み合わせにより、気道粘膜の分泌型IgAの力値が上昇し、実際に感染防御効果が実証された。このような効果は、従来、二本鎖RNAはアジュバントとして抗体まで産生するが、実際の感染防御効果を発揮しないことが多數報告されている現状にかんがみると、予想外の顕著な効果であるといえ

る。

- [0100] 本発明のワクチンは、粘膜投与によりその顕著な効果を達成することから、粘膜を経由する投与(例えば、経鼻投与、口腔内投与など)であればどのような経路を経由してもよいが、好ましい実施形態では、経鼻経路をとることができる。
- [0101] 好ましい実施形態では、本発明のワクチンの対象となる病原体は、例えば、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、風疹ウイルス、SARSウイルス、HIV、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb菌、肺炎菌およびコレラ菌からなる群より選択されるものであり得る。好ましくは、病原体は、インフルエンザウイルスである。本発明は、インフルエンザウイルスの型(A型、B型)内の株(例えば、H1N1など)内の亜型同士の交叉反応性を実質的に史上初めて示すワクチンを提示したという優れた効果を示す。場合によっては、型の壁を超えた交叉反応性を示すことから、本発明は、従来技術では達成されなかった効果を示す。インフルエンザウイルスは、毎年流行が変わり、ウイルス自体が変化することから、従来毎年予測してインフルエンザウイルスのワクチンを調製していた。しかし、本発明により、株、亜種を超えた交叉反応性が達成されることから、流行を予測しなくても予め有効なインフルエンザワクチンを提供することができるようになったという効果が示される。また、予測する必要がなくなったことから、長期保存したワクチンを利用可能とすることができる。
- [0102] 好ましい実施形態では、本発明で使用される病原体のサブユニットは、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、PB1、PB2、PAおよびNS2からなる群より選択されるサブユニットを含む。より好ましくは、表面に提示されているサブユニット(例えば、HA、NA)を用いる。より好ましくは、この表面提示サブユニットを複数(例えば、HAおよびNA)使用することが有利である。表面に提示されているサブユニットを使用することによって、より有効な抗原抗体反応を惹起し得、中和抗体を惹起することが可能となるからである。
- [0103] 好ましくは、二本鎖RNAは、分泌型IgAを産生するに十分な濃度で存在する。そのような二本鎖RNAの濃度は、例えば、0.1～10mg/mlであり、より好ましくは、0.5～2mg/mlであり、さらに好ましくは、約1mg/ml(例えば、0.8～1.2mg/ml

)である。

- [0104] 好ましくは、二本鎖RNAは、分泌型IgAを産生するに十分なサイズで提供される。そのようなサイズとしては、例えば、10²bp以上であり、0～3×10⁶bp、より好ましくは300bp以上の大きさが好ましいがそれらに限定されない。本発明の二本鎖RNAのサイズの上限は限定されないが、例えば、サイズの上限としては、10⁸bpが挙げられるがそれらに限定されない。
- [0105] 好ましい実施形態において、本発明のワクチンにおいて使用されるサブユニットは、少なくともNAまたはHAを含むことが有利である。これらの一方、より好ましくは両方を含むことによって、有効に中和抗体を惹起し得、抗ウイルス効果が達成されるからである。
- [0106] 二本鎖RNAは、好ましくは、Poly(I:C)を含むが、他の二本鎖RNA(例えば、Poly(A:U)、Poly(G:C)、それらの混合物などを用いることができる。Poly(I:C)は、どのようなものを用いてもよく、ヌクレオチドが改変されていても改変されていなくてもよい。
- [0107] 別の局面において、本発明は、感染性疾患を予防するための方法を提供する。この方法は、A)粘膜投与のためのワクチンであって、a)二本鎖RNA(好ましくは、Poly(I:C));およびb)ウイルスのサブユニット抗原、を含む、ワクチンを、少なくとも1回粘膜投与する工程を包含する。ワクチンの粘膜投与は、投与される部位に応じて適切な形態で行うことができる。経鼻投与の場合、噴霧、塗布、あるいは直接ワクチン液をたらすなどの種々の方法を用いることができる。
- [0108] ワクチン投与は、好ましくは、少なくとも2回行うことが有效である。このような免疫を、場合によって追加免疫という。追加免疫を行うことによって、より効果の高い感染防御効果を奏すことができる。
- [0109] 複数回ワクチン投与を行う場合、間隔は少なくとも1週間以上、より好ましくは3週間以上あけることがこのましい。二本鎖RNA、Poly(I:C)、抗原などの態様は本明細書中上述のとおり行うことができる。
- [0110] 別の局面において、本発明は、感染疾患を予防するためのワクチンキットを提供する。このキットは、A)粘膜投与のためのワクチンであってa)二本鎖RNA;およびb)ウ

イルスのサブユニット抗原、を含む、ワクチン;ならびにB)該ワクチンを、少なくとも1回投与することを指示する指示書、を備える。このキットは、医薬品としてパッケージで販売され得る。指示書は、厚生労働省などの当局の認可を示す文言と、使用方法を示す文言が記載されている。ワクチンの調製、投与方法は、本明細書中上述のとおりである。

- [0111] (インフルエンザワクチンサブユニット抗原のポリペプチド形態)
1つの局面において、本発明は、感染症の疾患、障害または状態の予防、処置または予後のための組成物であって、予防、処置または予後上有効な量のインフルエンザワクチンサブユニット抗原、またはそのフラグメントもしくは改変体と、二本鎖RNAを含む、組成物を提供する。ここで、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参照しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、既往歴などを考慮して、当業者が容易に決定することができる(例えば、「ワクチンハンドブック」、国立予防衛生研究所学友会編(1994);「予防接種の手引き 第8版」、木村三生夫、平山宗宏、堺春美編、近代出版(2000);「生物学的製剤基準」、細菌製剤協会編(1993)などを参照のこと)。

- [0112] 以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

- [0113] 以下の実施例では、対象となる患者からはすべて事前に告知しコンセントもらった上で実験を行った。動物の取り扱いは、国立感染症研究所および大阪大学において規定される基準を遵守した。以下の実施例で使用した試薬は、シグマアルドリッヂャパン、ヤマサ醤油、Flukaのいずれかから入手した。

- [0114] (実施例1. 合成二本鎖RNAであるPoly(I:C)のアジュバント作用)

本実施例では、合成二本鎖RNAとしてPoly(I:C)をアジュバントとして用いて不活性ウイルスまたはサブユニット抗原の中和抗体惹起能、ひいては感染防御効果を確認した。

[0115] (材料)

マウス: BALB/cマウス(6週齢、雌)

ウイルス: インフルエンザウイルスH1N1(A/PR8)株(国立感染症研究所(東京都新宿区戸山1-23-1)から入手した)

ワクチン: インフルエンザウイルスH1N1(A/PR8)株H1N1(A/Beijing)株(国立感染症研究所); H1N1(A/Yamagata)株(国立感染症研究所); H3N2(A/Guizhou)株(国立感染症研究所); エーテル処理不活化HAワクチン(財団法人阪大微生物病研究会、香川県観音寺市八幡町2-9-41)

アジュバント: ポジティブコントロールとしてCTB*(CTB(コレラ毒素Bサブユニット)、0.1%CT(コレラ毒素)を含む)、Poly(I:C)。

[0116] (方法)

6週齢のBALB/cマウス(日本SLC(株)、東京)各群5匹ずつを用いた。PR8HAワクチン(国立感染症研究所、財団法人 阪大微生物病研究会)1 μ gをそれぞれのアジュバントとしてPoly(I:C)、0.1 μ g、1 μ g、3 μ g、10 μ gと共にそれぞれの鼻腔内に5 μ lを接種し3週後同量のワクチンをアジュバントなしもしくはアジュバント有りを経鼻接種し、さらに2週後に、100pfuのPR8インフルエンザウイルスを片鼻1.2 μ lずつ接種し感染を行った。コントロールとしてPoly(I:C) 10 μ gおよび1 μ gのみ、PR8HAワクチンのみ、処置なしの群をおいた。感染3日後に鼻腔洗浄液、血清を回収し、鼻腔洗浄液中のIgA、血清中のIgGをELISA法を用い、鼻腔洗浄液中のウイルス価をMDCK細胞を用いたplaques assayで測定した。

[0117] 同様に経鼻免疫したマウスに40LD₅₀の致死量(10^{4.7}EID₅₀(50%の発育鶏卵において感染性を示すウイルス量の約50000倍量)のウイルスを20 μ l感染しその生存を観察した。

[0118] Poly(I:C)をアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御をみると、亞型の違うインフルエンザウイルスH1N1(A/PR8)株H1N1(Beijing)株、H1N1(A/Yamagata)株、H3N2(A/Guizhou)株のワクチンを3 μ gのPoly(I:C)とともに経鼻接種し3週後ワクチンのみを接種、さらに2週後に100pfuのPR8インフルエンザウイルスを片鼻1.2 μ lずつ接種し感染を行った。感染3日後に鼻腔洗浄

液、血清を回収し、鼻腔洗浄液中のIgA、血清中のIgGをELISA法を用い、鼻腔洗浄液中のウイルス価をMDCK細胞を用いたプラークアッセイで測定した。

[0119] (結果)

Poly(I:C)をアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンによる抗体誘導と感染防御

Poly(I:C)の粘膜アジュバント能を評価した。6週間前に1 μ gのPR8ワクチンを0. 1 μ g-10 μ gに変量したPoly(I:C)と共に経鼻接種し更に2週間前に同量のワクチンをワクチンのみまたはアジュバントと共に経鼻接種した。鼻腔粘膜でのIgA抗体応答と血中IgG応答を図1に示した。Poly(I:C)の用量依存性のアジュバント効果を見るためにPoly(I:C)の量は0. 1 μ gから10 μ gまで段階的に増やしそのアジュバント作用をみた。その結果鼻腔粘膜にIgAの応答のためには最低で0. 1 μ gのPoly(I:C)を初回免疫時に使うと応答が見られる。鼻腔粘膜に誘導されるIgAの量はPoly(I:C)の量依存的であり量を増やせば増やすほどそのアジュバント効果がみられた。2回の免疫とともにPoly(I:C)を用いると1 μ gの量で鼻腔洗浄液中に100ng/ml以上のIgA分泌がみられ、初回のみの利用の場合3 μ gのPoly(I:C)添加で100ng/ml以上の特異的IgA誘導がみられている。血清中のIgGも同時にしらべたがそれはIgAの分泌に相関するものであり1 μ gのPR8ワクチンをPoly(I:C)と共に4週間隔で2回免疫すると1. 5 μ g/mlの血中IgGが得られた。

[0120] また、同様の免疫条件で2回目の免疫の2週間後に100pfuのPR8ウイルスを片鼻1. 2 μ lずつ感染を行った。ワクチン接種をしないコントロール群では鼻腔洗浄液中に 10^3 pfu/ml以上のウイルス価にウイルス増殖が見られた(図2)。しかし、Poly(I:C)併用で経鼻ワクチン接種を2回行った群、では完全にウイルス増殖が抑制され、また、ワクチン単独で1 μ g以上ずつ2回免疫した群、3 μ g以上のPoly(I:C)を初回免疫時のみに使用した群ではまったくウイルス抑制効果は見られなかった(図2)。

[0121] また、1 μ g、0. 1 μ gのPoly(I:C)を初回のみ併用した群でも $10^{0.8}$ pfu/ml、 10^1 pfu/mlと著明なウイルスの増殖抑制が見られた。ワクチンのみの2回投与群ではウイルスの増殖抑制はまったく見られなかった。

[0122] Poly(I:C)のアジュバント作用に二本鎖RNAである構造が重要であることを示す

ため、Poly(I:C)を100°Cで5分間加熱し、ただちに氷上で冷却し1 μ gをワクチンと共に経鼻接種した。その結果、変性無しのとき121 μ g/ml見られていたIgA応答は21 μ g/mlに激減し血中のIgG応答も1.5 μ g/mlから0.7 μ g/mlに減少した。

[0123] また、Poly(I:C)のdenatureによってウイルスの増殖抑制効果も見られなくなった。

[0124] 次にPoly(I:C)併用経鼻ワクチン接種による致死量のインフルエンザウイルス感染による肺炎の防御効果について検討した。6週間前に1 μ gのPR8ワクチンとPoly(I:C)を10 μ g、3 μ g、1 μ g併用し経鼻接種、2週間前にワクチンのみで追加免疫し、4LD₅₀のPR8ウイルス20 μ l感染後、肺炎の防御能を調べた。ワクチンを施さない群ではマウスは1週間以内に5/5が死亡し3日後の肺のウイルス価も10⁶pfu以上にのぼった。しかしワクチン群では1 μ g以上のPoly(I:C)併用で全マウスが生存した。この結果を以下に示す。

[0125] [表1]

ワクチン						
PR8 (μg)	一次			二次		
	Poly (I:C) (μg)	PR8 (μg)	Poly (I:C) (μg)	チヤレンジ (40 LD ₅₀)	肺ウイルス力値 (PFU / ml ; 10 ⁿ)	生存/総マウス
1	10	1	10	A / PR8	< 0*	5 / 5
1	10	1	-	A / PR8	N.D.	5 / 5
1	3	1	-	A / PR8	N.D.	5 / 5
1	1	1	-	A / PR8	N.D.	5 / 5
1	CTB*	1	CTB*	A / PR8	< 0*	5 / 5
	-	-	-	A / PR8	6.2 ± 5.4	0 / 5

このように、Poly (I:C) はアジュバントとして感染防御に十分な粘膜 IgA 抗体応答を引き出すことができる事がわかった。

[0126] (実施例2: Poly (I:C) 併用経鼻ワクチンによる交叉防御)

Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されるインフルエンザ感染防御についてその交叉防御能について検討を行った。PR8と亜型の違うインフルエンザウイルス株H1N1(A/Beijing)株H1N1(Yamagata)株H3N2(A/Guizhou)株のワクチンを3 μ gのPoly(I:C)と初回免疫し4週後に同じ株のワクチンのみを接種、さらに2週間後に100pfuのH1N1(A/PR8)株を100pfu感染させその3日後に鼻腔洗浄液中のPR8と交叉反応するIgA、血清中のIgGを測定、またPR8ウイルスの交叉防御による感染防御について調べた。

- [0127] 図3、4に示すごとく同じ亜型のH1N1(A/Beijing)株H1N1(A/Yamagata)株に対してはIgA、IgG応答ともに見られウイルスの感染も完全に抑えた。亜型の違うH3N2(A/Guizhou)株に対しては交叉反応するIgA、IgGが少量みられウイルス感染の部分防御がみられた。
- [0128] このようにPoly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンによる交叉防御が確認された。
- [0129] (実施例3:Poly(I:C)の中枢神経への安全性について)
Poly(I:C)をヒトの経鼻ワクチンとして用いる場合、鼻腔が脳と近接している為、中枢神経への安全性が重要である。そこでPoly(I:C)の安全性を確認する目的でBALB/cマウスへの脳内接種を試みた。0.25 μ g、2.5 μ g、25 μ gのPoly(I:C)を25 μ lのPBSに溶解し二段針を用いて脳内接種を行った。接種後の体重変化を測定しまた生存を観察した。対照として25 μ g、10 μ g、25 μ gのCTB*(CTB、0.1%CTを含む)を同様に25 μ lのPBSに溶解し脳内接種を行った。
- [0130] 図5に示すごとくPoly(I:C)脳内接種群のマウスは全群とも2週間以上生存し体重変化も25 μ g接種群で5%の体重減少がみられるのみであった。一方対照に用いたCTB*(CTB with 0.1%CT)を脳内接種した群においては10 μ g投与で1/5匹25 μ g投与で2/5匹それぞれ4日目で死亡し体重減少も15%に及んだ。
- [0131] (考察)
インフルエンザウイルスの感染防御に粘膜での分泌型IgA抗体が現行ワクチンで誘導されるIgG抗体よりも有効である事は数多くの研究結果よりあきらかである。粘膜でのIgA誘導には経鼻ワクチンが有効であるが多くの試みにもかかわらず現在のところ

ろヒトで使用できるアジュバントが確立されていない。合成二本鎖RNAであるPoly(I:C)はヒトへ静注された実績もありIgA誘導に有効であり経鼻ワクチンのアジュバントとしてヒトへの応用に有用であると考えられる。

- [0132] 本実施例の実験結果を踏まえると、Poly(I:C)は粘膜でのインフルエンザウイルス感染防御に有効な経鼻ワクチンのアジュバントとして有用性が高い。さらに他の病原体の粘膜ワクチンへの応用も考えられる。
- [0133] インフルエンザ等の呼吸器感染の防御には粘膜より分泌される特異的IgA抗体が非常に有効である。型の違うウイルスの交叉防御は粘膜に分泌されるIgA抗体が主に担っておりインフルエンザに自然罹患後回復したヒトにはこのIgA抗体が誘導され同亜型の変異ウイルスの流行に対しても感染防御ができる。未感染の個体の感染防御の方法にはワクチン接種があるが現在用いられている皮下接種によるワクチンでは粘膜免疫応答が得られず交叉防御能を持つ、より効果的なワクチン開発が求められている。粘膜での分泌型IgAの誘導には経鼻で抗原接種する方法が有るが抗原の接種のみでは十分な抗体応答はみられずより効果的な免疫応答の為ワクチンと同時に投与するアジュバントが必要となる。
- [0134] 本実施例では、本発明者らは粘膜免疫誘導に有効なアジュバントとして合成二本鎖RNAであるPoly(I:C)を用い鼻腔粘膜でのIgA分泌と血清中のIgG応答と致死量のインフルエンザウイルスに対する感染防御を実証した。
- [0135] その免疫応答はワクチン株と亜型の違うウイルスに対する抗体誘導もみられまたワクチン株と亜型の異なるウイルスに対する感染防御もみられ、交叉防御能が確認された。また、経鼻ワクチンの人への応用を考える場合アジュバントの安全性が問題になる。今回用いた経鼻接種では投与部位が中枢神経に非常に近接した部位であるためその神経系へ与える影響と安全性を確認する為に0.25 μg～25 μg/mouseの量のPoly(I:C)を脳内接種を行った。その結果対照としたコレラ毒素Bサブユニットに0.1%の全毒素を添加したコレラ毒素(CTB)では4日目で死亡するマウスが見られ(10 μg投与群で1、5、25 μg投与群で2/5)体重も15%以上の減少が見られたのに対し、poloy(I:C)投与群では全てのマウスが8日間生存し体重減少も25 μg接種群で一過性に5%ほどみられたに留まり、過剰量の脳内接種でも死亡がみられず

安全性も確認された。

- [0136] 現行の不活化インフルエンザHAワクチンは、有効なワクチンであるが、インフルエンザウイルスの侵入門戸である呼吸器粘膜上皮でのIgA抗体の誘導能は低いため、これを改善することにより、さらにその効果が増強可能であると考えられる。本実施例における実験では、現行不活化インフルエンザHAワクチンにPoly(I:C)をアジュバントとして加え、これを経鼻投与することにより、ウイルス特異的IgAが粘膜表面に効率よく誘導されることが示された。また、マウスにおける実験で、ウイルスのチャレンジによる致死的感染を防御し、かつ、異なる株のウイルスのチャレンジにおいても有効であることが示唆された。
- [0137] また、利用の可能性としてインフルエンザウイルス以外に、呼吸器その他の粘膜経路で感染する病原体(水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、風疹ウイルス、SARSウイルス、HIV、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb菌、肺炎菌およびコレラ菌等の不活化抗原ワクチンのアジュバントとしても利用が考えられる。
- [0138] (実施例4:不活化ウイルス粒子をPoly(I:C)と併用する経鼻インフルエンザワクチンとして用いたときの予防効果)
現行のエーテル処理HA(Split-product vaccine)のみではなく、他の形態のワクチンを使用した場合のPoly(I:C)併用経鼻ワクチンの有用性を確認した。
- [0139] (材料)
ワクチン:エーテル処理HAワクチン(財団法人阪大微生物研究会製)、ホルマリン不活化全ウイルス粒子ワクチン(Inactivated whole particle vaccine)、A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルス(財団法人阪大微生物研究会製)
マウス:BALB/cマウス(6週齢、雌)。
- [0140] (方法)
A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルスのホルマリン不活化全ウイルス粒子ワクチン(Inactivated whole particle vaccine) (0.1 μ g)をPoly(I:C) (100–1000bp, Sigma) (0.1 μ g)併用経鼻インフルエンザワクチンのワクチン成分と

してBALB/cマウス(6週齢、雌)に投与し、3週間後に同じワクチンを2回目投与した。

[0141] その1週間後にマウスの鼻洗浄液と血清中のHAとNAに対する抗体応答をそれぞれ粘膜および全身の防御免疫の指標として測定した。

[0142] (結果)

不活性全ウイルス粒子をPoly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンのワクチン成分として用いたときにも、粘膜の防御免疫および全身の防御免疫が高められた。

[0143] しかも、ワクチンとPoly(I:C)とをそれぞれ0.1 μ gで用いたときでも、split-product vaccineをCTB*と併用して完全なウイルス感染阻止が予測されるアジュバント活性の陽性対照群と同等の応答を示した。さらに、これらの応答は、split-product vaccineをPoly(I:C)とともに用いた場合よりも高かった。したがって、split-product vaccineのみではなく、他の形態のワクチンを使用した場合にもPoly(I:C)併用経鼻ワクチンの有用性が明らかであった(図6)。

[0144] (実施例5:経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてのPoly(I:C)の分子の大きさ)

経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして有用なPoly(I:C)の分子の大きさを検討した。

[0145] (材料)

ウイルス:A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルス

Poly(I:C) サイズ: (L) 10–300bp(Fluka)、(M) 100–1000bp(Sigma)、(H)
 $>3.3 \times 10^6$ bp(Fluka)

マウス: BALB/cマウス(6週齢、雌)。

[0146] (方法)

A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルスのSplit-product vaccine(0.4 μ g)を様々な大きさのPoly(I:C) (10–300bp(Fluka)、(M) 100–1000bp(Sigma)、(H) $>3.3 \times 10^6$ bp(Fluka))の0.1 μ gといっしょにBALB/cマウス(6週齢、雌)に経鼻投与し、3週間後に同じワクチンを2回目投与した。その1週間後にマウスの鼻洗浄液および血清中のHAおよびNAに対する抗体応答をそれぞれ粘膜

および全身の防御免疫の指標として測定した。

[0147] (結果)

Poly(I:C)の分子の大きさが10–300bpを用いた実験群において他の2群よりも低い粘膜免疫応答が認められた。従って、経鼻インフルエンザワクチンのアジュvantとして有用なPoly(I:C)の分子の大きさは約300bp以上と考えられる(図7)。

[0148] (実施例6:Poly(I:C)以外の2本鎖RNAのアジュvant作用)

Poly(I:C)の経鼻インフルエンザワクチンのアジュvantとしての作用を、他の2本鎖RNAであるPoly(A:U)および単鎖のPoly(A, U)と比較した。

[0149] (材料)

サブユニット:精製HA

アジュvant:Poly(I:C)、Poly(A:U)、Poly(A, U)。

[0150] (方法)

A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルスから特異的抗HAモノクローナル抗体結合カラムを用いてHA分子を精製し、その1 μ gをPoly(A:U)(Sigma)および単鎖のPoly(A, U)(Sigma)の1 μ gといっしょにBALB/cマウス(6週齢、雌)に経鼻投与し、3週後にHAのみを2回目投与した。その1週間後にマウスの鼻洗浄液および血清中のHAに対する抗体応答をそれぞれ粘膜および全身の防御免疫の指標として測定した。

[0151] (結果)

Poly(A:U)および単鎖Poly(A, U)にもアジュvant活性が認められた。Poly(I:C)のアジュvant活性と比べると、Poly(A:U)、単鎖(A, U)の順に小さかった(図8)

従って、Poly(I:C)以外の二本鎖RNAにも経鼻インフルエンザワクチンと併用するとアジュvant活性が見られることが確認された。

[0152] (実施例7:Poly(I:C)併用経鼻投与条件でいくつかのインフルエンザウイルスのサブユニットによる防御免疫誘導)

Poly(I:C)併用経鼻投与条件でいくつかのインフルエンザウイルスのサブユニットは防御免疫を誘導することを確認した。

[0153] (材料)

サブユニット: HA、NA、M1 および NP

アジュバント: Poly(I:C) (100–1000bp, Sigma)

マウス: BALB/cマウス (6週齢、雌)。

[0154] (方法)

Poly(I:C)と一緒に経鼻投与されたインフルエンザウイルスのサブユニット、HA、NA、M1 および NP の防御効果誘導能を比較した。即ち、A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルスから特異的抗モノクローナル抗体結合カラムを用いて HA、NA、M1 および NP 分子を精製し、その $1\ \mu\text{g}$ を Poly(I:C) (100–1000bp, Sigma) の $1\ \mu\text{g}$ と一緒に BALB/cマウス (6週齢、雌) に経鼻投与し、3週間後にそれぞれの分子を2回目投与した。その一週間後にマウスの鼻洗浄液および血清中のそれぞれの分子に対する抗体応答を粘膜および全身の防御免疫の指標として測定した。

[0155] (結果)

Poly(I:C) はどのサブユニットに対する粘膜および全身の免疫応答をも増強することが示された。しかしながら、HA および NA に対する液性免疫増強によっては予防効果が高められたが、NP に対する液性免疫増強によっては予防効果を高められなかつた。従つて、HA および NA が強い防御抗原であり、サブユニットによって予防効果誘導能に違いもあることが分かった。

[0156] (実施例8: Poly(I:C) 併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高める投与回数と投与間隔)

Poly(I:C) 併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高める投与回数と投与間隔を検討する。

[0157] (材料)

ワクチン: A/New Caledonia/20/99(H1N1)ウイルスの Split-product vaccine ($1\ \mu\text{g}$)

アジュバント: Poly(I:C) [100–1000bp, Sigma]

マウス: BALB/cマウス (6週齢、雌)。

[0158] (方法)

Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高める投与回数と投与間隔を検討するために、A／New Caledonia／20／99(H1N1)ウイルスのSplit-product vaccine(1 μ g)をPoly(I:C)(100–1000bp, Sigma)の1 μ gと一緒にB ALB／cマウス(6週齢、雌)に経鼻投与し、1、3、4、6週間後に同じワクチンを2回目投与した。その1あるいは2週間後にマウスの鼻洗浄液および血清中のHAおよびNAに対する抗体応答をそれぞれ粘膜および全身の防御免疫の指標にして測定した。また、この時一回投与のみで1および8週後の実験群もおかれた。

[0159] (結果)

一週間以上の間隔で2回以上の投与がPoly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高めるのに有効であった(図9)。

[0160] (実施例9:Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンのヒトでの予防効果)

Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチンのヒトでの有効性について抗インフルエンザ抗体応答から確認する。

[0161] (材料)

ワクチン:現行のインフルエンザの三価ワクチン[A／New Caledonia(H1N1)、A／Panama(H3N2)、B／Shangdongの3ウイルス株由来のsplit-product vaccine](財団法人阪大微生物病研究会)

アジュバント:Poly(I:C)(100–1000bp, Sigma)。

[0162] (被験者)

健常人 2–数名。

[0163] (方法)

健康成人に、400 μ g/mlの三価ワクチンと700 μ g/mlのPolyI:Cを含む液を、300 μ L(150 μ Lずつ左右鼻腔に)噴霧投与し、さらに4週間後再投与する。再投与後二週間目に唾液及び血清材料を採取し、HAおよびNAに対する抗体応答を測定する。投与前、2回投与後の抗体価の比によって、この経鼻ワクチンの抗体応答誘導能を評価する。

(結果)

被験者にワクチン中の3株に対する唾液中のIgA抗体の増加が認められる。

[0164] また、一部の被験者において、血清中の抗NA-IgG抗体やHI抗体の上昇が認められる。

[0165] (実施例10:百日咳のワクチンをPoly(I:C)と共に経鼻投与した場合の免疫能の増強)

インフルエンザ以外感染症である百日咳のワクチンをPoly(I:C)と共に経鼻投与した場合の免疫能の増強を確認した。

[0166] (材料)

ワクチン: 百日咳ワクチン(財団法人阪大微生物研究会製)

アジュバント: Poly(I:C) (100-1000bp, Sigma)

マウス: BALB/cマウス(6週齢、雌)。

[0167] (方法1)

百日咳ワクチン(財団法人阪大微生物研究会製) (1-3 μ g)をPoly(I:C) (100-1000bp, Sigma)、の0. 1 μ g-10 μ gと一緒にBALB/cマウス(6週齢、雌)に経鼻投与し、3週間後に同じワクチンを2回目投与した。2回

目投与後1週間目のマウスの鼻洗浄液と血清中の百日咳ワクチンに対する抗体応答をEL

ISA法により測定し、粘膜および全身の防御免疫の指標とした。

[0168] (結果)

Poly(I:C)は百日咳ワクチンに対する防御免疫をも高め、インフルエンザ以外の感染症に対するワクチンに対する防御免疫増強にも有効であることが示唆された(図10)。

[0169] (方法2)

百日咳ワクチン(財団法人阪大微生物研究会製) (1-3 μ g)をPoly(I:C) (100-1000bp, Sigma)、の0. 1-10 μ gと一緒にBALB/cマウス(6週齢、雌)に経鼻投与し、3週後に同じワクチンを2回目投与した。2回目投与後一週間にマウスの鼻洗浄液と血清中の百日咳ワクチンに対する抗体応答をELISA法により測定し、粘膜と全身の防御免疫の指標とした。また、2回目投与後2-3週間後に、百日咳菌強毒株を免疫マウスの脳内あるいは鼻腔内(噴霧)に接種14日間観察し、免疫マウスの

生存率から効果を推定した。

[0170] (結果)

マウス生存率から、Poly(I:C)は百日咳ワクチンに対する防御免疫をも高め、インフルエンザ以外の感染症に対するワクチンに対する防御免疫増強に有効であることが確認された。

[0171] (実施例11:水痘ワクチンをPoly(I:C)とともに経鼻投与した場合のヒトでの予防効果)

追加接種としてPoly(I:C)併用経鼻水痘生ワクチンの成人での安全性および有効性について、経鼻粘膜接種法により行い、液性免疫および細胞性免疫を水痘ワクチン単独経鼻接種を行った群と比較する。

[0172] (材料)

ワクチン:水痘生ワクチン(財団法人阪大微生物研究会製)

アジュバント:Poly(I:C) (100–1000bp, Sigma)

健常人:各群2–数名。

[0173] (方法)

水痘生ワクチン2バイアル／人に注射用生理食塩水中を加え、これを健康成人にネプライザーで経鼻接種する。また、現行のワクチンとPoly(I:C) (100–1000bp, Sigma)を含むワクチン液を、300 μ l (150 μ lずつ左右鼻腔に) 噴霧投与する。液性免疫および細胞性免疫を測定することにより、予防効果を確認する。

[0174] (結果)

Poly(I:C)は水痘生ワクチンに対する防御免疫をも高め、インフルエンザ以外の感染症に対するワクチンに対する防御免疫増強に有効であることが示唆される。

[0175] 以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

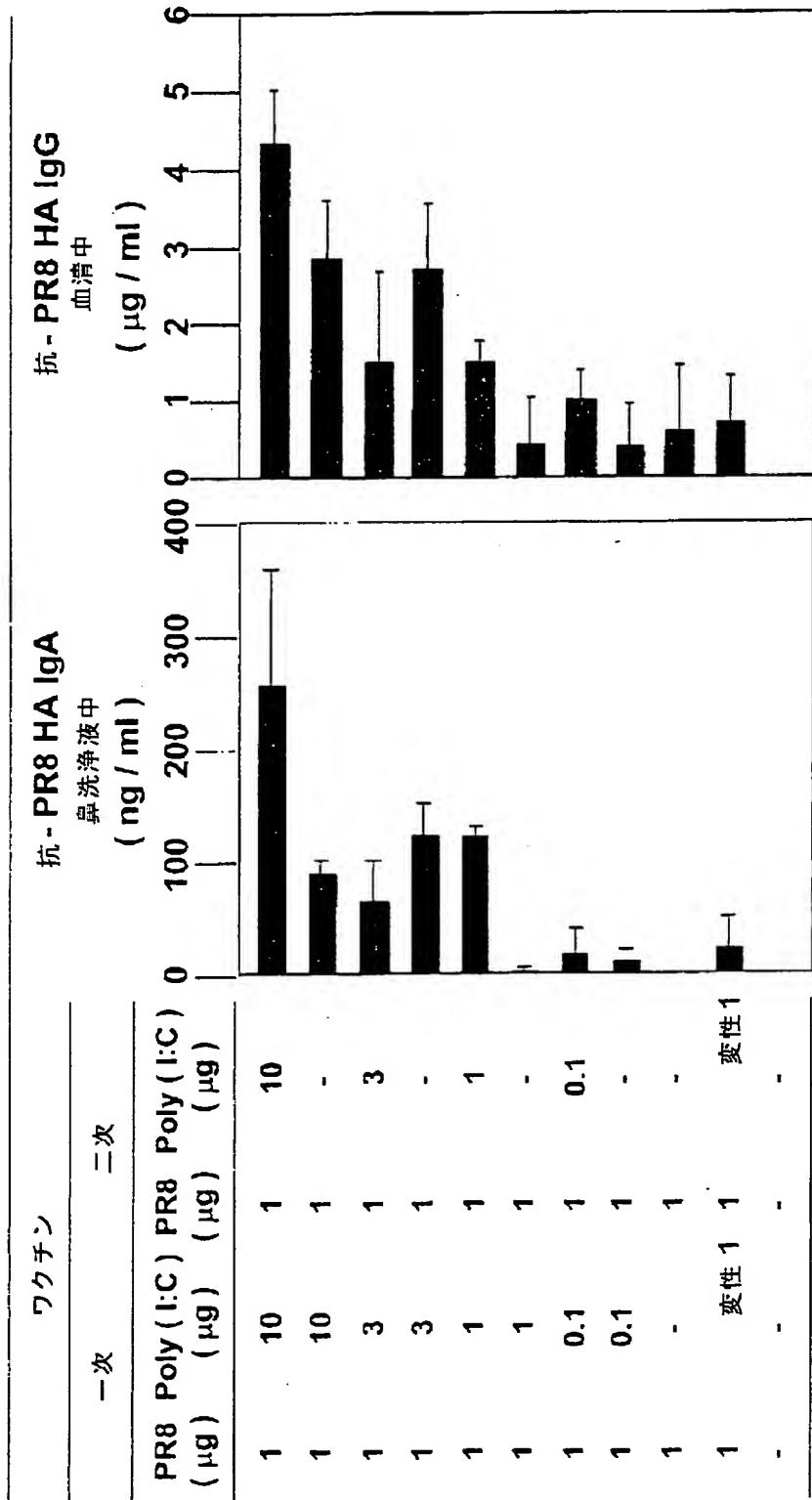
[0176] 本発明により、粘膜投与により簡単にワクチン接種し、かつ、交叉免疫性を得ることができるワクチン形態が提供される。これにより、例えば、インフルエンザウイルス対策において、有効なワクチンを製造することができ、効率よい予防対策を講じるための医薬などの産業において大いに利用される可能性がある。

請求の範囲

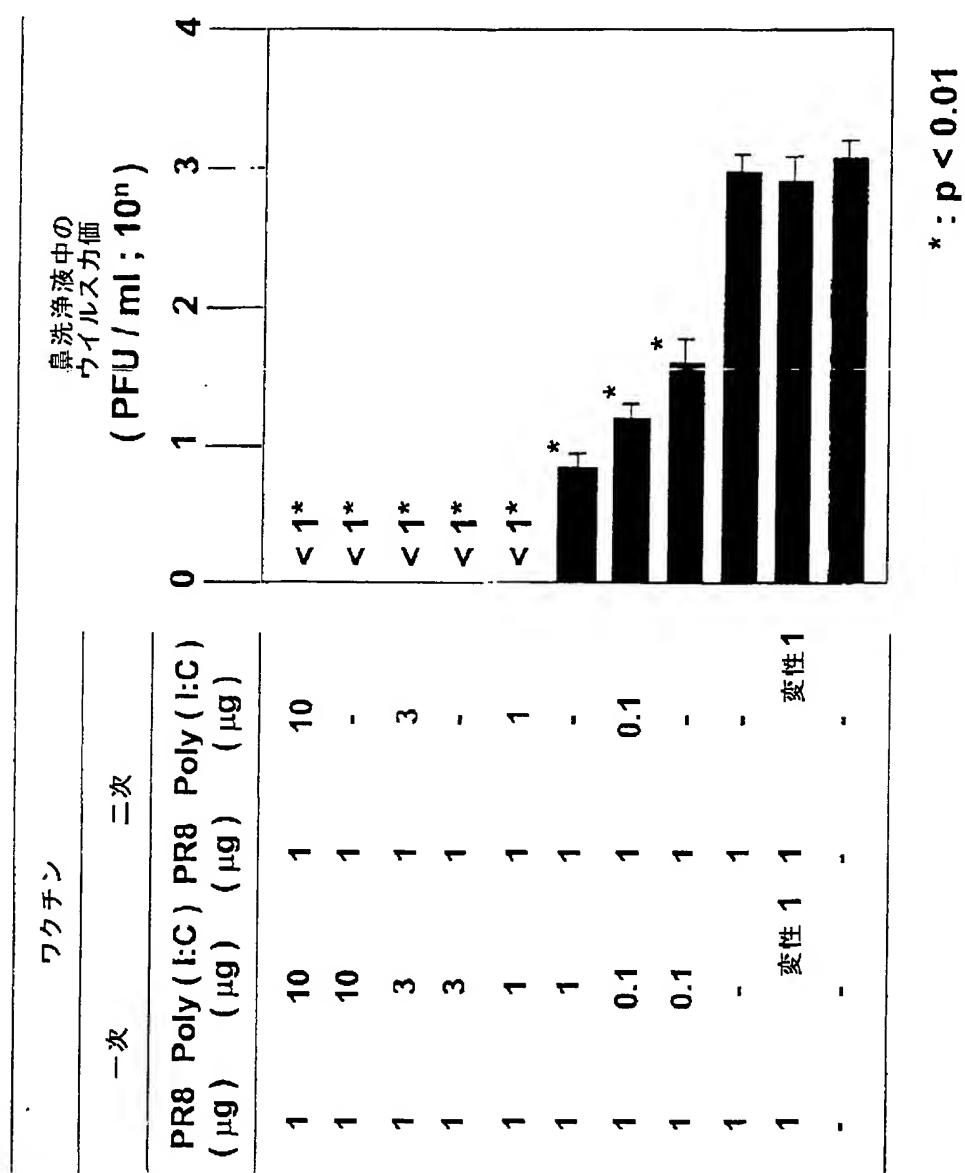
- [1] 粘膜投与のためのワクチンであって、
 - A) 二本鎖RNA; および
 - B) 病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
を含む、ワクチン。
- [2] 前記粘膜は、鼻の粘膜を含む、請求項1に記載のワクチン。
- [3] 前記病原体は、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、風疹ウイルス、重症急性呼吸器症候群ウイルス(SARSウイルス)、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、百日咳菌、髓膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎菌およびコレラ菌からなる群より選択される、請求項1に記載のワクチン。
- [4] 前記病原体は、インフルエンザウイルスである、請求項1に記載のワクチン。
- [5] 前記サブユニットは、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、PB1、PB2、PAおよびNS2からなる群より選択される少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項1に記載のワクチン。
- [6] 前記二本鎖RNAは、分泌型IgAを産生するに十分な濃度で存在する、請求項1に記載のワクチン。
- [7] 前記二本鎖RNAは、0.1～10mg/mlの濃度で存在する、請求項1に記載のワクチン。
- [8] 前記二本鎖RNAのサイズは、10²～10⁸bpである、請求項1に記載のワクチン。
- [9] 前記サブユニットは、少なくともNAまたはHAを含む、請求項1に記載のワクチン。
- [10] 前記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、請求項1に記載のワクチン。
- [11] 感染疾患を予防するための方法であって、
 - A) 粘膜投与のためのワクチンであって、
 - a) 二本鎖RNA; および
 - b) 病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
を含む、ワクチンを、少なくとも1回粘膜投与する工程を包含する、方法。
- [12] 前記ワクチンの投与は、少なくとも2回行われる、請求項11に記載の方法。

- [13] 前記ワクチンの投与は、間隔が少なくとも1週間以上である、請求項11に記載の方法。
 - 。
- [14] 前記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、請求項11に記載の方法。
- [15] 感染疾患を予防するためのワクチンキットであって、
 - A)粘膜投与のためのワクチンであって
 - a)二本鎖RNA;および
 - b)病原体のサブユニット抗原または不活化抗原、
を含む、ワクチン;ならびに
 - B)該ワクチンを、少なくとも1回粘膜投与することを指示する指示書、
を備える、キット。
- [16] 前記ワクチンの投与は、少なくとも2回行われる、請求項15に記載のキット。
- [17] 前記ワクチンの投与は、間隔が少なくとも1週間以上である、請求項15に記載のキット。
- [18] 前記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、請求項15に記載のキット。
- [19] 二本鎖RNAの、ワクチンの粘膜投与のための使用。
- [20] 前記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、請求項19に記載の使用。
- [21] 二本鎖RNAの、粘膜投与のためのワクチンの製造のための使用。
- [22] 前記二本鎖RNAは、Poly(I:C)を含む、請求項21に記載の使用。

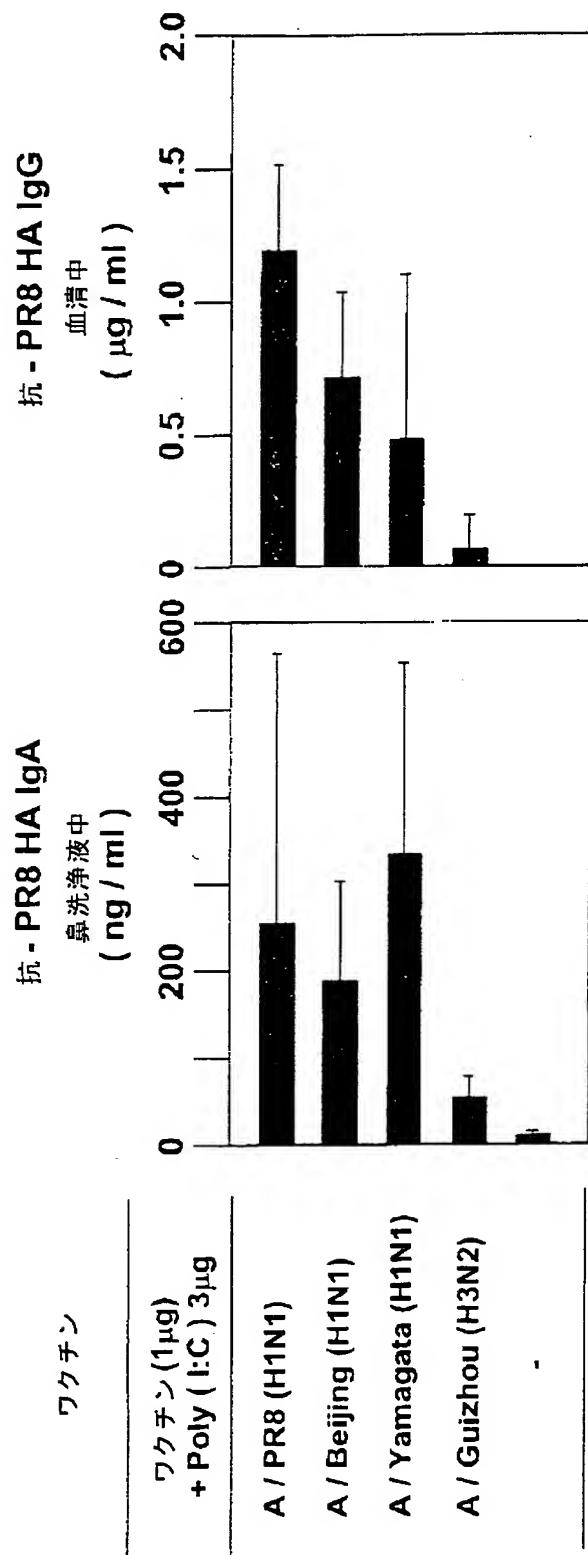
[図1]



[図2]

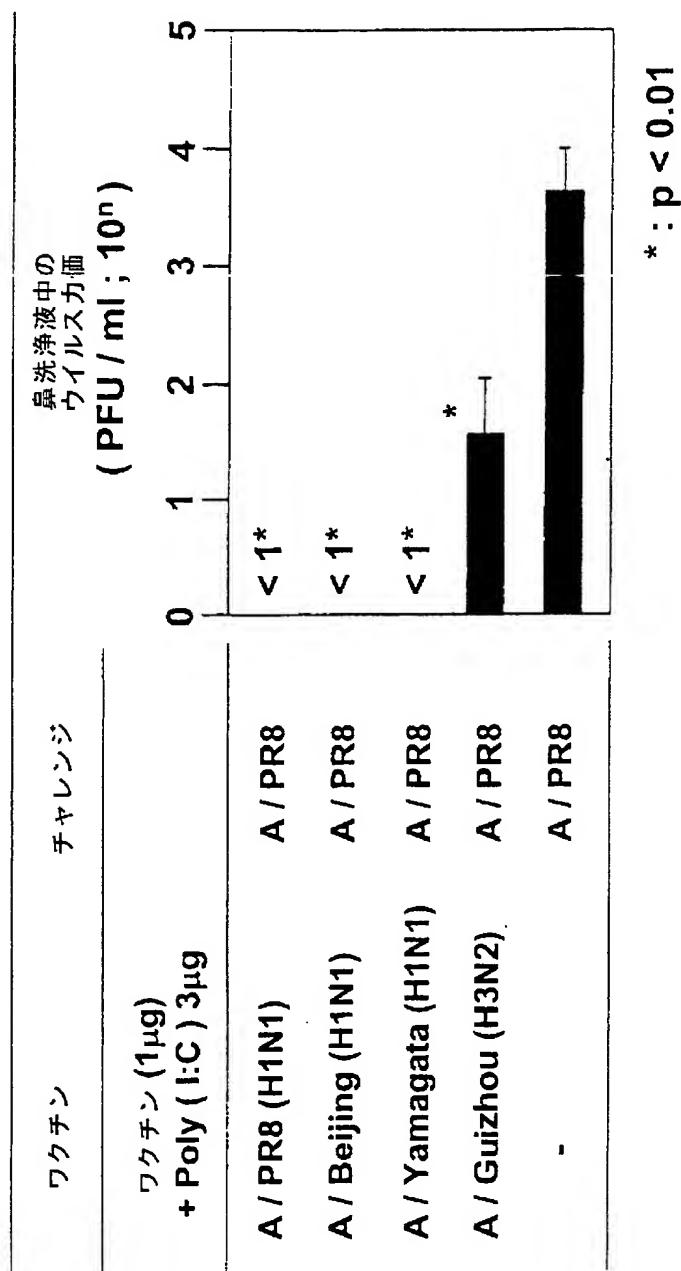


[図3]



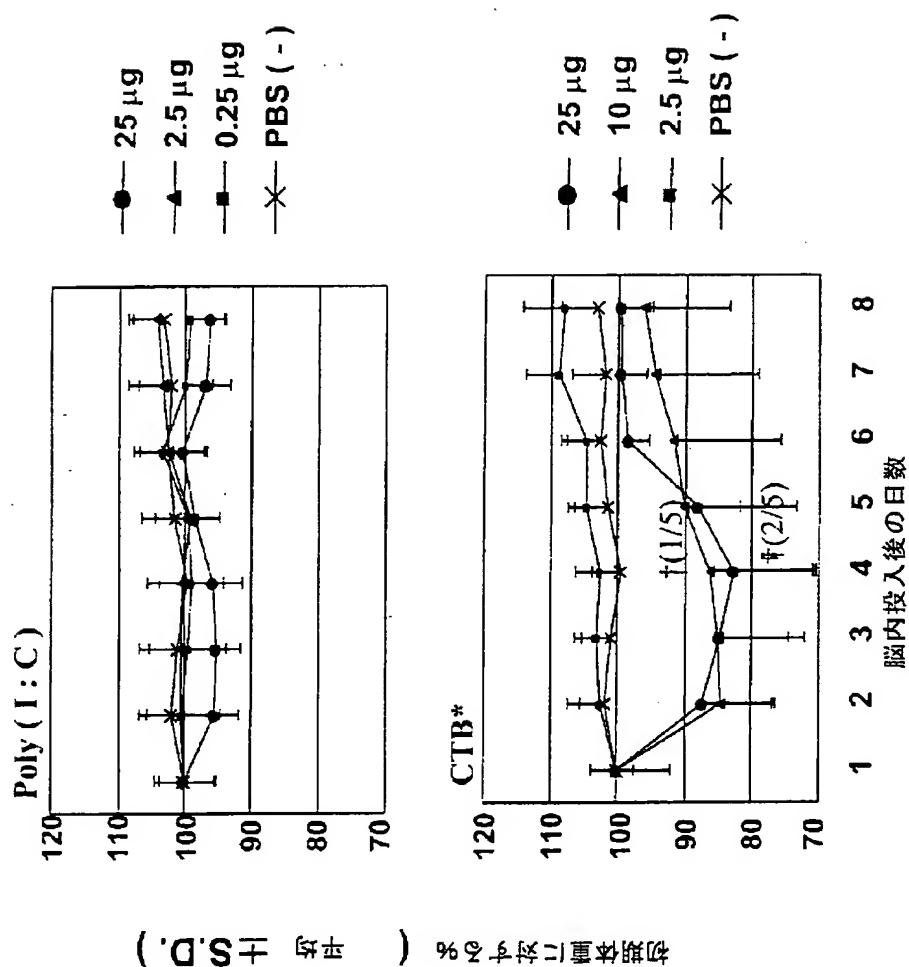
注: これはワクチンのみ

[図4]

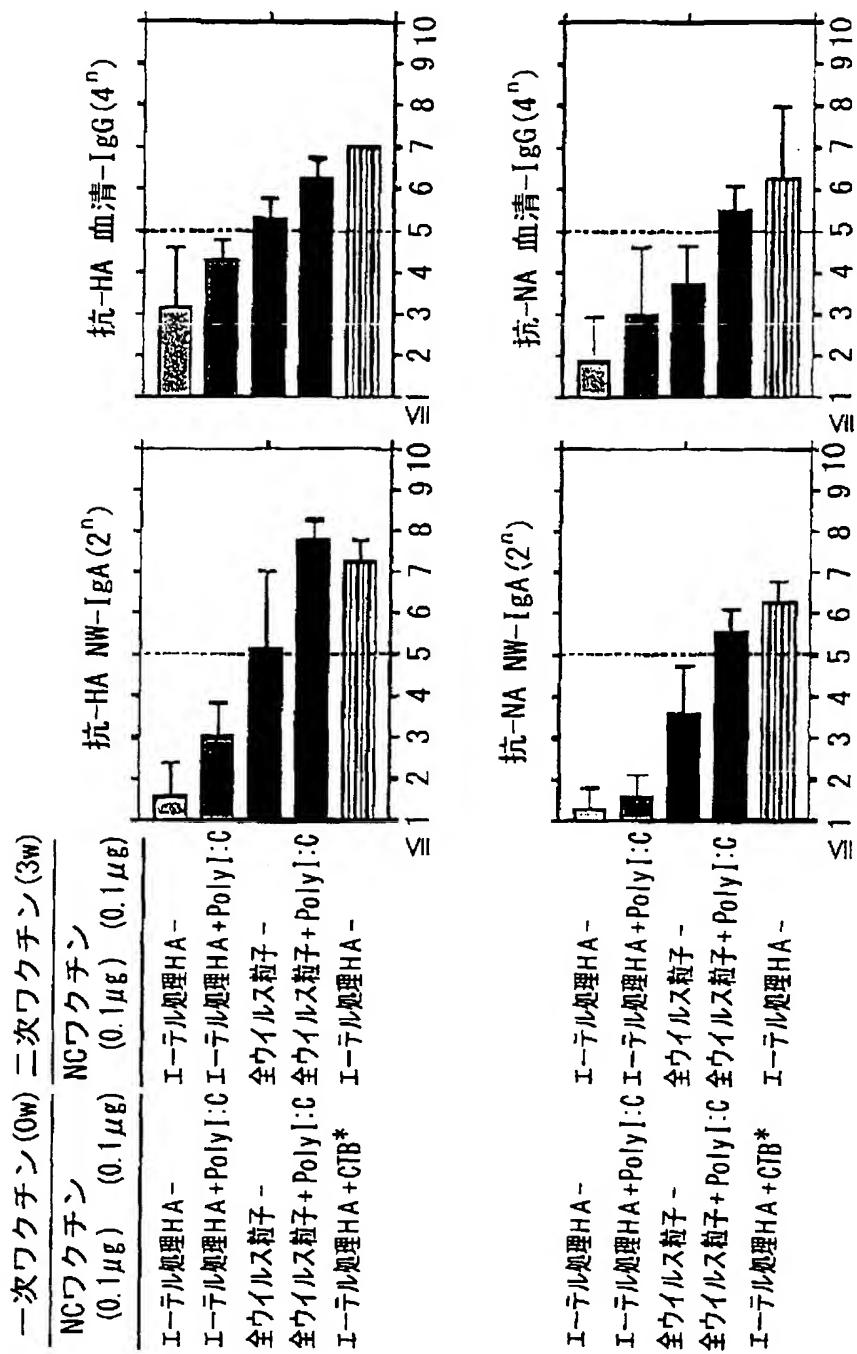


注:ニ次はワクチンのみ

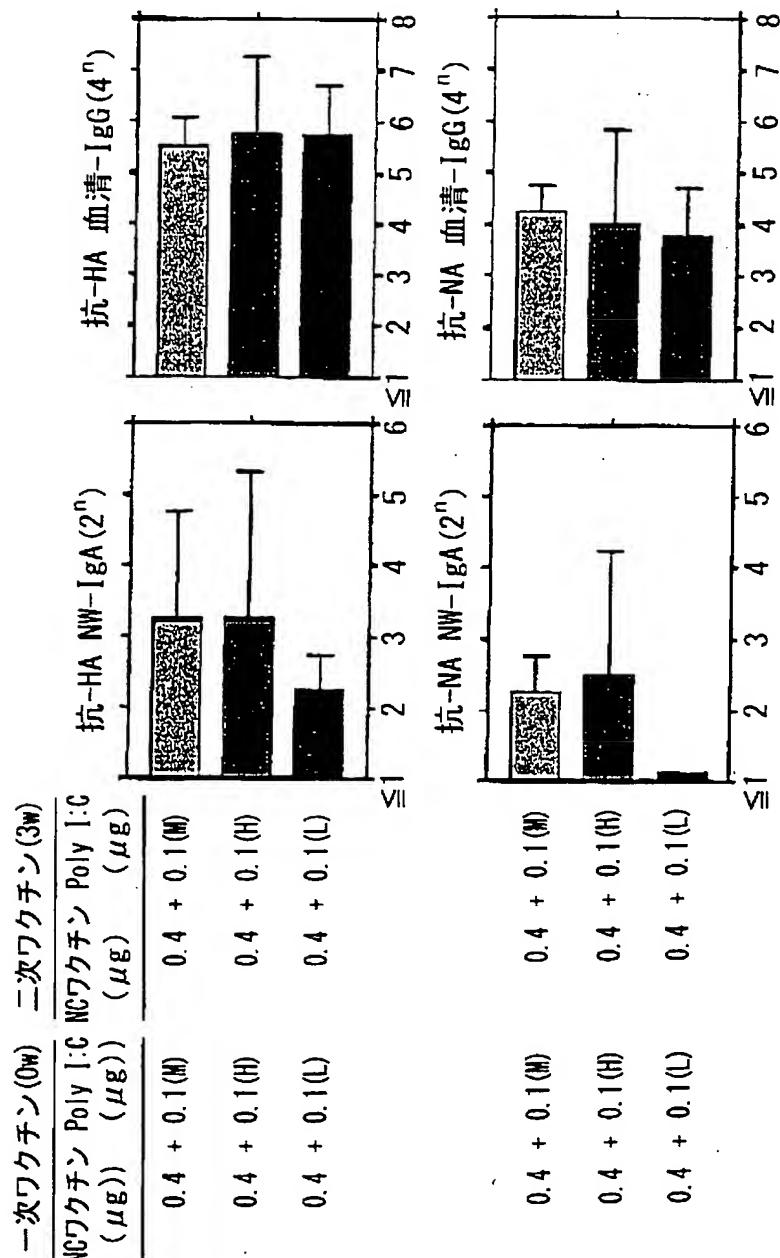
[図5]



[图6]



[図7]



[図8]

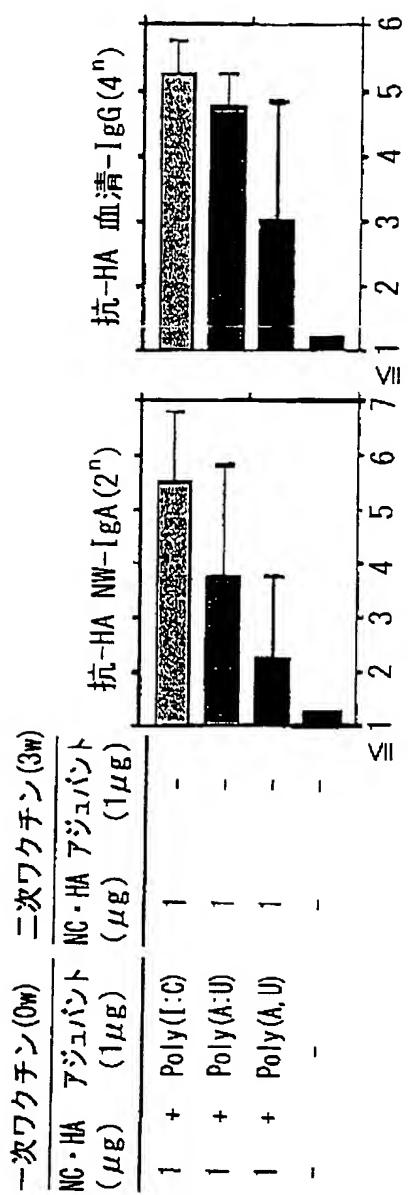
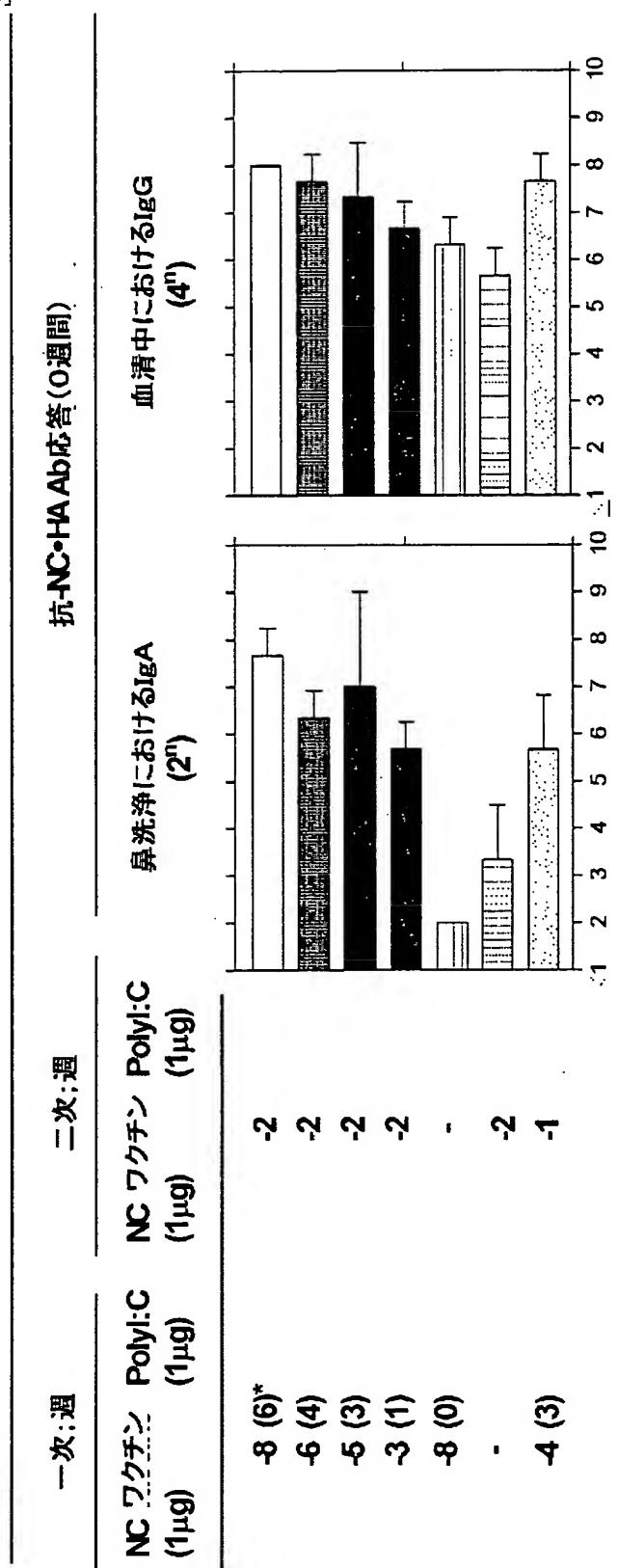
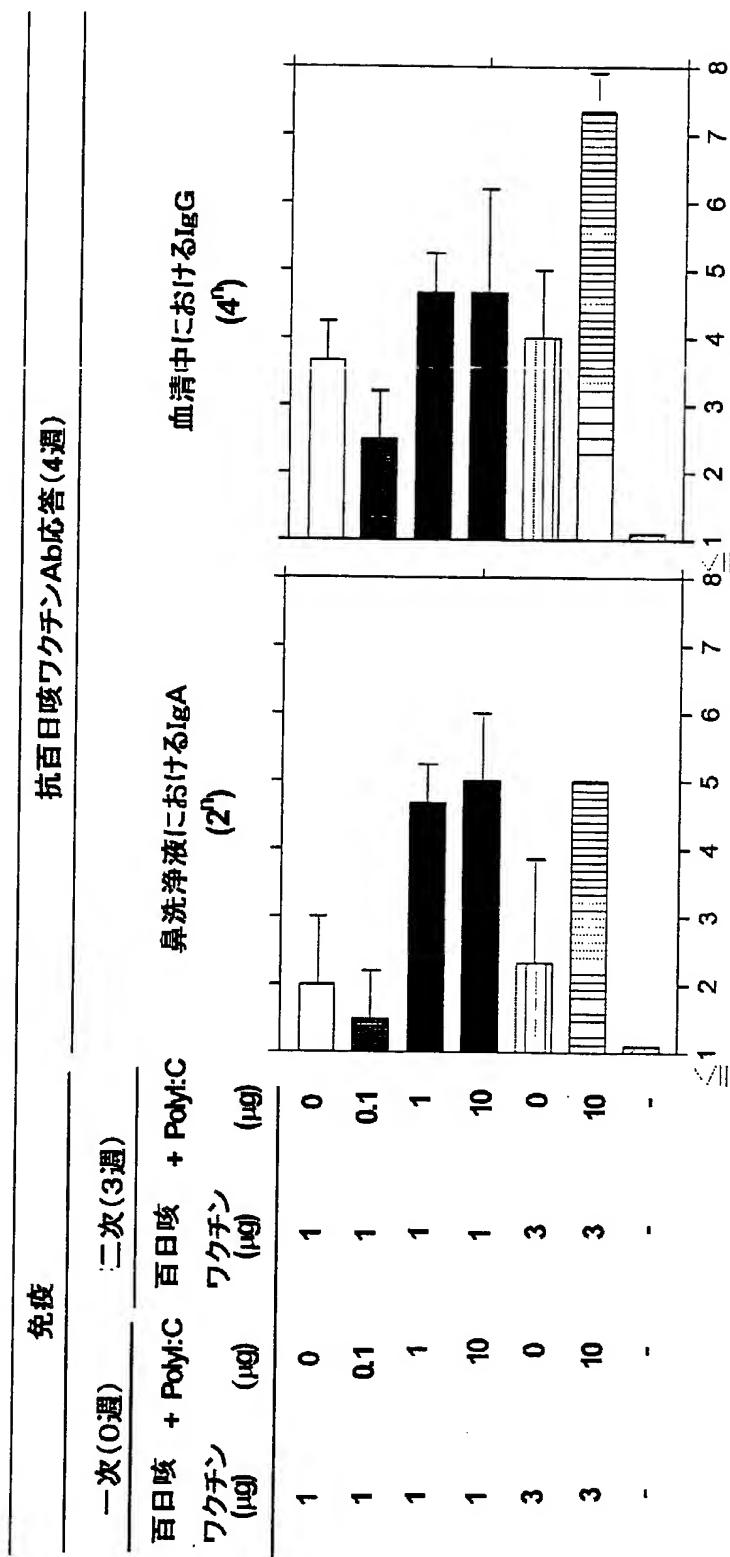


図9



*(); *(); 1次ワクチン接種および二次ワクチン接種との間の間隔(インターバル)

[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/12, 39/09, 39/106, 39/13, 39/145, 39/165, 39/20, 39/21, 39/235, 39/245, 39/25, 39/285, 39/39, A61P31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/12, 39/09, 39/106, 39/13, 39/145, 39/165, 39/20, 39/21, 39/235, 39/245, 39/25, 39/285, 39/39

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRY, L.S. et al., Antibody in tears following intranasal vaccination with inactivated virus, Investigative Ophthalmology, 1971, Vol.10, No.10, pages 760 to 769	1-10,15-18
X	HARRY, L.S. et al., Antibody in tears following intranasal vaccination with inactivated virus, Investigative Ophthalmology, 1971, Vol.10, No.10, pages 751 to 759	1-10,15-18
X	WANG, L. et al., Noncoding RNA danger motifd bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination, J.Clin.Invest., 2002, Vol.110, No.8, pages 1175 to 1184	1-10,15-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 September, 2004 (15.09.04)Date of mailing of the international search report
12 October, 2004 (12.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-516294 A (LOEB HEALTH RESEARCH INSTITUTE AT THE OTTAWA HOSPITAL), 04 June, 2002 (04.06.02), Claims; Par. Nos. [0044], [0056] to [0057], [0091] to [0094] & WO 99/61056 A1	1-10,15-18
X	JP 2002-526425 A (The Regents of the University of California), 20 August, 2002 (20.08.02), Claims; Par. Nos. [0029] to [0031], [0061] & WO 00/20039 A1	1-10,19-22
X	JP 2003-510282 A (University of Iowa Research Foundation), 18 March, 2003 (18.03.03), Claims & WO 01/22972 A1	1-10,19-22
X	JP 2002-536293 A (Children's Hospital Medical Center), 29 October, 2002 (29.10.02), Claims; Par. No. [0034] & WO 00/26380 A1	1-10,19-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/011488

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11-14, 19-22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 11 to 14 and 19 to 22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet.)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/011488

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K39/12, 39/09, 39/106, 39/13, 39/145, 39/165,
39/20, 39/21, 39/235, 39/245, 39/25, 39/285, 39/39, A61P31/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K39/12, 39/09, 39/106, 39/13, 39/145, 39/165,
39/20, 39/21, 39/235, 39/245, 39/25, 39/285, 39/39

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus(JOIS)

C: 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	HARRY, L. S. et al, Antibody in tears following intranasal vaccination with inactivated virus, Investigative Ophthalmology, 1971, Vol.10, No.10, pp.760-769	1-10, 15-18
X	HARRY, L. S. et al, Antibody in tears following intranasal vaccination with inactivated virus, Investigative Ophthalmology, 1971, Vol.10, No.10, pp.751-759	1-10, 15-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.09.2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C 3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WANG, L. et al, Noncoding RNA danger motifd bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination, J. Clin. Invest., 2002, Vol. 110, No. 8, pp. 1175-1184	1-10, 15-18
X	JP 2002-516294 A (ロープ ヘルス リサーチ インスティテュート アット ザ オタワ ホスピタル) 2002. 06. 04, 【特許請求の範囲】，【0044】，【0056】-【0057】，【0091】-【0094】 & WO 99/61056 A1	1-10, 15-18
X	JP 2002-526425 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブカリフォルニア) 2002. 08. 20, 【特許請求の範囲】，【0029】-【0031】，【0061】 & WO 00/20039 A1	1-10, 19-22
X	JP 2003-510282 A (ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーション) 2003. 03. 18, 【特許請求の範囲】 & WO 01/22972 A1	1-10, 19-22
X	JP 2002-536293 A (チルドレンズ ホスピタル メディカル センター) 2002. 10. 29, 【特許請求の範囲】，【0034】 & WO 00/26380 A1	1-10, 19-22

第二欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 11-14, 19-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲11-14, 19-22は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第三欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)